



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	19F-NMR 測定によるリポソームを生体膜モデルとした吸入麻酔薬の作用部位の研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	本間, 将一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12170号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62243
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Shoichi_Honma_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏名 本間 将一

学位論文題名

^{19}F -NMR 測定によるリポソームを生体膜モデルとした吸入麻酔薬の作用部位の研究

【目的】 全身麻酔薬は臨床において不可欠な薬剤として長年にわたり使用されているが、多くの研究にもかかわらずその作用機序に関してはいまだに不明な点が多い。作用機序の仮説には全身麻酔薬がニューロン膜の特定の機能性タンパク質に結合して麻酔作用を発揮するという特異説と、麻酔薬があらゆる細胞の生体膜に作用し麻酔作用を発現するという非特異説がある。このように全身麻酔薬の作用機序に関しては一定の見解が得られていないが、生体膜が作用の場であることに関しては一般的に受け入れられている。本論文では全身麻酔薬は生体膜の構造あるいはその物性に変化を起こすことにより作用を発現するという非特異説の立場から、生体膜モデルとしてegg yolk phosphatidylcholine (EYPC) から作成した多重層リポソーム (MLV) 及び大きな一枚膜リポソーム (LUV) を使用し、MLV及びLUVと相互作用するイソフルラン分子の挙動、また、MLVと相互作用するセボフルラン及びデスフルランの挙動を ^{19}F -NMRを用いて観察し、イソフルランのMLVとLUVに対する作用部位とセボフルラン及びデスフルランのMLVに対する作用部位を検討した。また、 ^{19}F -NMRの測定による吸入麻酔薬水溶液の濃度決定を試みた。

【方法】 緩衝液に吸入麻酔薬を液滴が生じるように過剰に添加し、密栓して 4℃で一晩攪拌し、吸入麻酔薬水溶液を得た。吸入麻酔薬の ^{19}F -NMR 測定には化学シフト及び吸入麻酔薬濃度測定の基準物質としてトリフルオロ酢酸 (TFA) を使用した。常法に従い、EYPC から MLV 及び LUV を作成し、MLV 及び LUV に対するイソフルラン、また、MLV に対するセボフルラン及びデスフルランの影響を検討するため、 ^{19}F -NMR スペクトルを測定し、リポソームの有無での線形、化学シフト、spin-lattice relaxation time (T_1)、spin-spin relaxation time (T_2) を比較した。また、リポソーム膜の比較的表層の環境に関する情報を得るためにスピンラベル剤である 5-doxyl stearic acid (5-DSA)、深部の情報を得るために 16-doxyl stearic acid (16-DSA) を MLV 及び LUV に混入した。 ^{19}F -NMR スペクトルに対するスピンラベル剤の影響を調べることにより、MLV と LUV におけるイソフルラン分子、また、MLV におけるセボフルラン、デスフルラン分子とスピンラベル剤の位置を推測した。また、 ^{19}F -NMR 測定から得られた TFA の CF_3 基とイソフルラン及びデスフルランの CF_3 基の面積比を基にイソフルラン及びデスフルラン水溶液の濃度を決定した。セボフルランは TFA の CF_3 基とセボフルランの $\text{CF}_3\text{-CF}_3$ 基との面積比を測定して濃度を決定した。

【結果と考察】 MLV 及び LUV 溶液にイソフルラン、MLV 溶液にセボフルランあるいはデスフルランを加えても、 ^{19}F -NMR スペクトルの線形と化学シフトには変化は認められなかったが、 $1/T_2$ 値は $1/T_1$ 値に比べ著しく増加した。これらの結果は、リポソーム膜上に結合している吸入麻酔薬分子と結合していない分子が結合と解離を繰り返す化学交換をしていることを示唆する。吸入麻酔薬に対するリポソーム中の 5-DSA および 16-DSA のスピラベル剤の影響を調べたところ、 ^{19}F -NMR スペクトルの半値幅が広くなり、 $1/T_1$ 及び $1/T_2$ 値はスピラベル剤との相互作用によって著しく大きくなった。その程度は 5-DSA 系のほうが大きかった。これらの結果は、5-DSA 及び 16-DSA の電子と吸入麻酔薬の ^{19}F 核との間に磁気的雙極子-雙極子相互作用が新たに生じた結果と考えられた。磁気的雙極子-雙極子相互作用による $1/T_1$ 値と $1/T_2$ 値の変化は、5-DSA 及び 16-DSA 電子と ^{19}F 原子間の距離の 6 乗に反比例するため、影響の大きい 5-DSA のほうが 16-DSA より吸入麻酔薬分子との距離が近いことを示す。すなわち吸入麻酔薬分子はリポソーム膜の表層側に存在することが示唆された。もし、吸入麻酔薬分子がリポソーム膜の脂肪鎖の中に入り込むと仮定すると、16-DSA 溶液と 5-DSA 溶液において $1/T_1$ 値と $1/T_2$ 値に差は生じないと考えられる。今回の結果から、吸入麻酔薬は脂溶性の薬剤ではあるが、吸入麻酔薬分子はリポソーム膜の脂肪鎖の中に入り込まないものと示唆された。MLV 及び LUV 溶液ともにイソフルランの CF_2 基のほうが CF_3 基よりも半値幅が広くなり、 $1/T_2$ 値は大きくなった。これらの結果は、イソフルランの CF_2 基が CF_3 基よりもリポソームから大きな影響を受けることを示し、 CF_2 基がリポソームに向いて結合していることを示唆する。また、規格化した同一のイソフルラン濃度において $1/T_1$ 及び $1/T_2$ 値は MLV 溶液より LUV 溶液において 16-DSA 及び 5-DSA の影響を強く受けていた。この結果が MLV と LUV の構造的な相違によるものか、あるいは DSA（スピラベル剤）の分布濃度の相違によるのかを考察するために、MLV 及び LUV の膜構造とその大きさを仮定し、MLV 及び LUV の最外層のスピラベル剤の量の比率を検討した。MLV、LUV のそれぞれ大きさを直径 $0.8\ \mu\text{m}$ 、 $0.4\ \mu\text{m}$ とし、MLV の 2 層目直径 $0.6\ \mu\text{m}$ 、3 層目直径 $0.4\ \mu\text{m}$ と仮定した。MLV 及び LUV の内部にはイソフルランが入り込まなく、スピラベル剤が均一に分散していると仮定すると、イソフルラン濃度を規格化した $1/T_1$ 値及び $1/T_2$ 値の MLV と LUV の比率は、MLV 最外層膜と LUV 膜に存在するスピラベル剤の比率とほぼ一致した。よって、MLV 溶液より LUV 溶液のほうが 16-DSA 及び 5-DSA の影響を強く受ける理由はスピラベル剤の個数の差として説明可能である。また、イソフルラン分子はリポソーム膜の小胞内部に入り込まないとする前提も成立するため、イソフルラン分子はリポソーム膜小腔内部に入り込まないことが示唆された。吸入麻酔薬水溶液の麻酔薬濃度の決定は困難であるが、今回、 ^{19}F -NMR スペクトルの測定によって可能となり、イソフルラン、セボフルラン及びデスフルランの飽和水溶液の濃度は、それぞれ 42.8、15.4 及び 66.3 mM であった。

【結語】 吸入麻酔薬の MLV と LUV に対する作用部位を検討したところ、イソフルラン、セボフルラン及びデスフルランはリポソーム膜上でフリーなイソフルラン、セボフルラン及びデスフルラン分子と化学交換をしていることが示された。リポソームに 5-DSA あるいは

16-DSA を混入して ^{19}F -NMR スペクトルに対するスピンラベル剤の影響を調べたところ、イソフルラン、セボフルラン及びデスフルランがリポソーム膜の表層に結合し、リポソーム膜の脂肪鎖の中に入り込まないことが示唆された。イソフルラン分子は CF_2 基がリポソームに向いて結合しており、リポソームの内腔には入らないことが示唆された。 ^{19}F -NMR の測定によって、イソフルラン、セボフルラン及びデスフルラン水溶液の濃度を決定することができた。